7 月 July
2019, 62(7): 787 – 798

昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA

http://www.insect.org.cn
doi: 10.16380/j.kcxb.2019.07.002

小菜蛾保幼激素受体基因 *PxMet*-1 和 *PxMet*-2 的分子特性、表达模式与功能分析

彭 露[1,2,3,4], 杨一帆[1,2,3,4], 邹明民[1,2,3,4], 王 清[1,2,3,4], 尤民生[1,2,3,4,*]

(1. 福建农林大学, 闽台作物有害生物生态防控国家重点实验室, 福州 350002; 2. 福建农林大学应用生态研究所, 福州 350002;
3. 福建农林大学, 教育部害虫生态防控国际合作联合实验室, 福州 350002;
4. 福建农林大学, 福建省昆虫生态重点实验室, 福州 350002)

摘要:【目的】本研究旨在明确小菜蛾 *Plutella xylostella* 保幼激素受体基因 *Met* 的分子特性与表达模式,分析其生殖调控作用,为筛选有效控制小菜蛾的新靶标奠定基础。【方法】根据本课题组已有的小菜蛾基因组数据库,采用 PCR 技术克隆小菜蛾两个 Met 基因的 cDNA 全长序列;利用 qPCR 测定其在小菜蛾不同发育阶段及成虫不同组织中的表达模式;基于 RNAi 解析其在小菜蛾雌成虫生殖发育中的作用。【结果】克隆获得小菜蛾 *PxMet*-1(GenBank 登录号: MK697672)与 *PxMet*-2(GenBank 登录号: MK697673)的 cDNA 序列,开放阅读框(ORF)全长分别为 1 575 和 2 100 bp,预计分别编码 524 和 699 个氨基酸,理论分子质量分别为 60.5 和 70.7 kD,预测等电点分别为 6.73 和 5.50。PxMet-1 和 PxMet-2 都具有 4 个保守结构域,即 1 个 helix-loop-helix 结构域(bHLH)、2 个 PAS 保守结构域及 1 个 PAC 保守基序。系统发育树分析表明,小菜蛾 PxMet-1 和 PxMet-2 聚为不同的两支,但两者均与鳞翅目昆虫 Met 聚在一起。表达模式分析表明,小菜蛾 *PxMet*-1 与 *PxMet*-2 在蛹期(化蛹后 1 – 3 d)与雌成虫期(羽化后 0 – 72 h)均有表达;*PxMet*-1 的表达量在蛹期(化蛹后 1 – 3 d)无明显差异,但均显著高于雌成虫期(羽化后 0 – 48 h),在羽化后 72 h 达到高峰;而 *PxMet*-2 在雌成虫期(羽化后 0 – 48 h)的表达量呈先上升后下降的趋势,在羽化后 12 h 出现表达高峰,且成虫期(羽化后 0 – 36 h)的表达量显著高于蛹期。*PxMet*-1 与 *PxMet*-2 在成虫脂肪体中的表达量显著高于其他组织。注射 *PxMet*-1 + *PxMet*-2 dsRNA 24 h 后,小菜蛾 *PxMet*-1 与 *PxMet*-2 的表达量均受到显著抑制;同时干扰 *PxMet*-1 和 *PxMet*-2 后,小菜蛾成熟卵子数目显著减少,羽化后 3 d 内单雌产卵量显著下降。【结论】抑制 *Met* 基因表达能够显著降低小菜蛾雌虫的卵子形成与产卵量。本研究为探索保幼激素的生殖调控机理奠定了基础,在实践上有助于筛选小菜蛾种群遗传调控的潜在靶标。

关键词: 小菜蛾; 保幼激素受体; *Met*; 分子特性; 表达模式; 生殖调控; 害虫控制

中图分类号: Q966 **文献标识码**: A **文章编号**: 0454-6296(2019)07-0787-12

Molecular characterization, expression profiling and functional analysis of juvenile hormone receptor genes *PxMet*-1 and *PxMet*-2 in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae)

PENG Lu[1,2,3,4], YANG Yi-Fan[1,2,3,4], ZOU Ming-Min[1,2,3,4], WANG Qing[1,2,3,4], YOU Min-Sheng[1,2,3,4,*]

(1. State Key Laboratory of Ecological Pest Control for Fujian-Taiwan Crops, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. Institute of Applied Ecology, Fujian Agriculture and

基金项目: 国家自然科学基金项目(31772166); 福建省自然科学基金项目(高校联合)(2019J01666); 福建省科技重大专项(2018NZ0002-1)
作者简介: 彭露, 女, 1984 年 8 月生, 重庆北碚人, 博士, 讲师, 研究方向为农业昆虫与害虫防治, E-mail: pl526520@163.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: msyou@fafu.edu.cn
收稿日期 Received: 2019-01-21; 接受日期 Accepted: 2019-03-20

Forestry University, Fuzhou 350002, China; 3. Joint International Research Laboratory of Ecological Pest Control, Ministry of Education, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 4. Fujian Provincial Key Laboratory of Insect Ecology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract:【Aim】This study aims to clarify the molecular characteristics and expression patterns of juvenile hormone receptor genes (*Met*) and to analyze their functions in reproductive regulation in the diamondback moth, *Plutella xylostella*, so as to provide basis for screening new targets for effectively controlling the diamondback moth.【Methods】Based on the genome database of *P. xylostella* we obtained previously, the full-length cDNAs of two Met genes were cloned using PCR, and their expression patterns in different developmental stages and adult tissues of *P. xylostella* were detected via qPCR. Moreover, the role of the two Met genes in the reproductive development of female adults of *P. xylostella* was analyzed by RNAi.【Results】The cDNA sequences of *PxMet*-1 (GenBank accession no. MK697672) and *PxMet*-2 (GenBank accession no. MK697673) were cloned from *P. xylostella*, and they contain ORFs of 1 575 bp encoding 524 aa and 2 100 bp encoding 699 aa, respectively. The predicted molecular mass of PxMet-1 and PxMet-2 are 60.5 and 70.7 kD, and the theoretical isoelectric points are 6.73 and 5.50, respectively. PxMet-1 and PxMet-2 both contain a basic helix-loop-helix (bHLH) domain, two PAS motifs and one PAC motif. The results of phylogenetic tree analysis showed that PxMet-1 and PxMet-2 were clustered into different branches, but clustered into the same branch with lepidopteran Mets. The expression profiles showed that *PxMet*-1 and *PxMet*-2 were both expressed in the pupal stage (1 – 3 d after pupation) and female adult (0 – 72 h after eclosion). The expression level of *PxMet*-1 in the pupal stage (1 – 3 d after pupation) showed no significant difference, but was significantly higher than that in female adult (0 – 48 h after eclosion), and its expression peaked at 72 h after eclosion. In the female adult (0 – 48 h after eclosion), the mRNA level of *PxMet*-2 firstly increased, reached a peak at 12 h after eclosion, and then decreased. Moreover, the expression level of *PxMet*-2 at 0 – 36 h after eclosion was significantly higher than that in the pupal stage. The expression levels of *PxMet*-1 and *PxMet*-2 in the fat body of adult were significantly higher than those in other tissues. Injection of ds*PxMet*-1 and ds*PxMet*-2 significantly inhibited the expression of *PxMet*-1 and *PxMet*-2 within 24 h. In the female adults of *P. xylostella* with both *PxMet*-1 and *PxMet*-2 silenced, oogenesis was significantly inhibited, and the number of eggs laid per female within 3 d after eclosion significantly reduced.【Conclusion】Inhibition of the expression of *PxMet*-1 and *PxMet*-2 can significantly reduce egg maturation and oviposition of female *P. xylostella*. This study establishes a theoretical foundation for reproductive regulation mechanisms by JH in *P. xylostella* and facilitates screening potential targets used for genetic manipulation of *P. xylostella* populations.

Key words: *Plutella xylostella*; juvenile hormone receptor; *Met*; molecular characteristic; expression profile; reproductive regulation; pest management

小菜蛾 *Plutella xylostella* 属鳞翅目(Lepidoptera)菜蛾科(Plutellidae),是危害十字花科蔬菜的世界性害虫。因其世代周期短、繁殖能力强(Wei *et al*., 2010)、抗药性高(Baxter *et al*., 2010)、寄主范围广(Soufbaf *et al*., 2010; Fathi *et al*., 2011),造成其防治工作极具困难(胡奇和刘玉冬, 2003)。有数据统计,小菜蛾每年在全球范围内造成的损失和防治费约为 40 ~ 50 亿美元(Zalucki*et al*., 2012; Furlong *et al*., 2013),而每年在我国造成的损失和防治费则高达 7 亿美元(Li *et al*., 2016),但效果仍不明显。因此,寻求快速有效的控制小菜蛾危害的新方法亟不可待。

保幼激素(juvenile hormone, JH)是由咽侧体(corpora allata, CA)产生的一类倍半萜烯化合物,具有功能多效性。它控制着昆虫胚胎、幼虫、蛹、成虫各个生长发育阶段的多个时间节点,对昆虫发育

变态的转换起着开关作用。同时，在昆虫生殖发育过程中也起着至关重要的调控作用，可直接或间接影响昆虫生殖，包括激活昆虫卵黄发生与卵子成熟(Fei *et al*., 2005)，以及决定生殖过程中的营养分配等(Nouzova *et al*., 2011)。除此之外，也参与了昆虫其他生理活动，如迁飞、营养利用、表型变化以及级型分化等(Nijhout, 1994; Sun *et al*., 2013; Xu *et al*., 2013; Yamamoto *et al*., 2013; Mirth *et al*., 2014)。

虽然 JH 是调控昆虫发育、变态与生殖最为重要的激素之一，但对其分子调控机制的了解仍然相对匮乏，主要受制于对 JH 核受体的鉴定(周树堂等, 2012)。因此，JH 核受体基因的克隆和鉴定成为过去 20 多年其分子作用机制研究的重要内容之一。直到近些年才在一些模式昆虫，如埃及伊蚊 *Aedes aegypti* (Zou *et al*., 2013)、黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (Bilen *et al*., 2013)中逐步被解析，他们认为 Met 最有可能是 JH 的核受体(Charles *et al*., 2011; Jindra *et al*., 2013)。Met 属于 bHLH-PAS 家族蛋白成员，该家族蛋白的经典结构包括 1 段碱性 DNA 结合域的氨基酸序列(basic region)、1 个螺旋-环-螺旋结构(helix-loop-helix)、2 个空间可变的 PAS 结合域(PAS-A, PAS-B)、1 个 C 末端(PAC)。它通常以非共价形式与自身形成同质二聚体存在于真核细胞中，在果蝇 *Drosophila* 中首次发现了 Met 与自身，以及 Met 与其同源蛋白 Gce 形成的同质二聚体(Godlewski *et al*., 2006)。然而当 JH 存在时，Met 形成的同质二聚体需要解离，而与该家族其他成员聚合成异质二聚体，才能形成一个具有活性的转录因子，从而传递 JH 调控信号(Godlewski *et al*., 2006; Charles *et al*., 2011; Jindra *et al*., 2013)。

目前，越来越多的昆虫 *Met* 基因被陆续鉴定，包括家蚕 *Bombyx mori* (Suetsugu *et al*., 2013)、褐飞虱 *Nilaparvata lugens* (Lin *et al*., 2015)、德国小蠊 *Blattella germanica* (Lozano and Belles, 2014)、东亚飞蝗 *Locusta migratoria* (Wang *et al*., 2014)与大猿叶甲 *Colaphellus bowringi* (Liu *et al*., 2016)等，这为昆虫 *Met* 基因的分子功能研究奠定了基础。随着 Met 受体逐步明确，其在昆虫发育与生殖过程中的作用又成了学者们关注的新问题。许多研究表明，*Met* 基因在昆虫发育变态过程中具有重要作用，如控制赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 变态发育(Konopova and Jindra, 2007)，调控蜚蠊 *B. germanica* 的翅型分化(Lozano and Belles, 2014)等；同时，也有效参与了昆虫生殖过程，包括雌虫卵巢发育、卵黄发生、卵子形成、胚胎发育，以及产卵量、卵孵化率等(Guo *et al*., 2014; Marchal *et al*., 2014; Smykal *et al*., 2014)，以及雄虫副腺生长、副腺蛋白合成等(Wilson *et al*., 2003)。除此之外，*Met* 基因还可能参与了昆虫交配行为。Bilen 等(2013)研究发现，*Met* 突变 48 h 后，黑腹果蝇 *D. melanogaster* 主要的雌性特异性性信息素 C27 二烯烃释放显著增加，雌虫交配前期显著延长。

随着研究的逐步深入，*Met* 已成为害虫种群遗传调控的潜在新靶标。然而当前对 *Met* 在 JH 调控昆虫生长发育的研究更为细致，而对昆虫生殖调控的分子机理研究相对较少，鳞翅目昆虫尤其缺乏，小菜蛾 *Met* 的鉴定与分子功能研究仍为空白。明确小菜蛾 *Met* 的分子结构特征、表达模式及基因功能，可为初步阐明 JH 调控小菜蛾生殖发育的分子机理奠定基础。为全面解析激素调控下的小菜蛾生殖过程，挖掘有效控制小菜蛾的新靶标提供新的思路和途径。

1　材料与方法

1.1　供试昆虫

本实验所采用的供试昆虫为敏感品系(susceptible strain, SS)小菜蛾，原始种群于 2004 年采自福建省新店镇菜地(26.08°N, 119.28°E)，经过室内的长期连续继代培养，幼虫采用实验室种植的萝卜 *Raphanus sativus* 苗(福州立信种苗)喂养，成虫采用 10% 蜂蜜水喂养，并在交配瓶(顶部直径 9.5 cm，底部直径 5 cm，高度 15 cm)中进行交配产卵，交配瓶底部用小刀去除，用细纱网覆盖并封口，将塑料杯倒置于塑料培养皿内(直径 9 cm)，培养皿内分别放入添加菜汁与 10% 蜂蜜水的棉花(Peng *et al*., 2015)。昆虫与萝卜苗饲养环境为：温度 25 ± 1℃、相对湿度(RH)为 70% ~ 80%、光周期 16L∶8D，期间不使用任何农药。

1.2　小菜蛾 Met 基因的克隆

从 NCBI 数据库(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)下载已经鉴定的昆虫 Met 基因序列，基于已有的小菜蛾基因组数据库(Tang *et al*., 2014)通过本地 BLAST 搜索小菜蛾基因组与已知基因组信息的 3 种模式昆虫(家蚕 *B. mori*、黑腹果蝇 *D. melanogaster* 和埃及伊蚊 *A. aegypti*)的 *Met* 序列，筛选匹配值较高的序列，利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物。本实验采用长片段 PCR 的方法扩增目的基因的序列(表 1)。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物 Primers	引物序列 (5′–3′) Primer sequences	引物用途 Purpose
Met-1-F	ATGACGTCGTCGAACGGTCACG	测序 PCR Sequencing PCR
Met-1-R	CTATTTGGCAAGTCTGTTTTGT	
Met-2-F	ATGGCGGGGCCGGGCCGTTCG	
Met-2-R	CTCGGAGCCGAAGGAGGCGGTGTA	
Met-3-F	CAGGGGAGACAATCCCTGCGCT	
Met-3-R	TCAGAAAGTGGCTGCTCCGCCG	
Q-Met-1-F	GATCTGTGTCTTGCGTCAAATG	qPCR
Q-Met-1-R	TCCATCATCTTCCGTCCATAATC	
Q-Met-2-F	GACGCCCGAAACAAATGAAAG	
Q-Met-2-R	GCGCGGAATATCTCATCACA	
Q-RIBP-F	CAATCAGGCCAATTTACCGC	
Q-RIBP-R	CTGCGTTTACGCCAGTTACG	
ds-Met-1-F	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGGTCATCAGAAGGCAAAGAGTT	RNAi
ds-Met-1-R	TAATACGACTCACTATAGGGAGACAGTTCCTCAGTGGTCTCGTTG	
ds-Met-2-F	TAATACGACTCACTATAGGGAGATCCTCCTCACCGTCACCTAC	
ds-Met-2-R	TAATACGACTCACTATAGGGAGAAAACCGCCGAAGTCAGAGTC	
ds-EGFP-F	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGCTTCTCGTTGGGGTCTTTGC	
ds-EGFP-R	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGTCCAGGAGCGCACCATCTTC	

下划线标注的序列代表 T7 启动子序列。T7 promoter sequences are underlined.

取 8～10 头小菜蛾初羽化雌成虫，装入灭菌离心管中，经液氮处理后于 –80℃超低温冰箱冻存或直接采用 TaKaRa 通用 RNA 提取试剂盒（TakaRa，日本）进行 RNA 抽提。组织 RNA 提取采用 RNeasy Micro Kit（Qiagen）完成。均参照试剂盒说明书所提供的实验操作步骤进行。对提取的 RNA 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳，检测其完整性。并用分光光度计测定 RNA 的浓度和质量。选取 OD_{260}/OD_{280} 和 OD_{260}/OD_{230} 值在 1.8～2.2 的 RNA 样品保存于 –80℃冰箱备用。提取的总 RNA 依照 HiScript II Q RT SuperMix for qPCR（+gDNA Wiper）试剂盒提供的说明书合成 cDNA 第 1 链，于 –20℃保存备用。

以上述合成的 cDNA 为模板进行长片段 PCR 扩增反应。反应体系：5×Super-Fidelity（SF）Buffer 10 μL，cDNA 模板 3 μL，dNTP Mix（10 mmol/L）1 μL，上下游引物（10 μmol/L）各 1.5 μL，Phanta Super-Fidelity DNA Polymerase（1 U/μL）1 μL，最后用 ddH_2O 补足 50 μL。PCR 反应程序：95℃预变性 3 min；95℃变性 30 s，59℃退火 30 s，72℃延伸 1.5 min，共 41 个循环；72℃延伸 10 min。反应结束后，将 PCR 产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳（120 V，25 min）检测，根据 DNA 纯化回收试剂盒（TaKaRa，日本）说明书纯化回收目的片段，将胶回收的产物利用 Zero Blunt® PCR Cloning Kit（Invitrogen，美国）平末端连接酶连接至载体，并转化至 50 mL DH5α 大肠杆菌 *Escherichia coli* 感受态细胞（天根，中国），随后接种至带有氨苄抗生素的 LB 固体培养基中培养，37℃过夜培养，随机挑取多个单克隆进行 PCR 验证，鉴定阳性结果后送至博尚公司进行测序分析。

1.3 生物信息学分析

通过 DNAMAN 6.0 对 1.2 节测序获得的序列与预测的小菜蛾 *Met* 基因序列进行比对。利用 NCBI ORF 预测开放阅读框，应用 SMART（http://smart.embl-heidelberg.de/）鉴定保守结构域；通过 Expasy 在线工具 pI/Mw（http://web.expasy.org/compute_pi/）预测蛋白的分子质量与理论等电点；利用 NCBIblast（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/）搜索其他昆虫 Met 氨基酸序列，使用 ClustalW 2.0 将小菜蛾 Met 基因与其他昆虫的 Met 基因进行氨基酸序列比对；利用 MEGA 6.06 软件，采用邻接法构建系统发育树。

1.4 实时荧光定量 PCR 检测小菜蛾 Met 基因表达模式

根据已克隆验证的小菜蛾 Met 基因 cDNA 序列设计荧光定量 PCR 引物，并以 *RIBP* 为内参基因，引

物序列见表 1。收集小菜蛾不同龄期样品(化蛹后 1－3 d 雌蛹以及羽化后 0, 12, 24, 36, 48 和 72 h 的雌成虫)立即放置到液氮冷冻,置于－80℃保存。收集的小菜蛾样品包括 3 个生物学重复,每个重复收集 10 头个体。收集初羽化的小菜蛾雌成虫(羽化时间控制在 12 h 内)的组织,包括头、脂肪体、肠道(中肠与马氏管)、卵巢和残渣。首先将其置于二氧化碳麻醉台进行麻醉,随后置于体视显微镜下,在去核酸酶的无菌水中解剖与清洗,将获得的组织置于 RNALater 保护液中,于 4℃下保存(保存时长不超过一周)。RNA 提取与 cDNA 合成方法参照 1.2 节。采用 GoTaq® qPCR Master Mix Kit(Promega, Madison, WI)进行实时荧光定量 PCR(20 μL): qPCR Master Mix 10.0 μL, cDNA 模板 2.0 μL, 上下游引物(10 μmol/L)各 0.4 μL, CXR 0.2 μL 以及 ddH_2O 7 μL。qPCR 反应程序: 95℃预变性 30 s; 95℃变性 5 s, 58℃退火延伸 30 s,共 44 次循环。

1.5　双链 RNA 合成

采用 T7 启动子体外转录方法,基于 Met 保守结构域设计带有 T7 启动子序列的 dsRNA 引物和对照 *EGFP* 基因的 dsRNA 引物(表 1)。PCR 反应条件: 95℃预变性 3 min; 95℃变性 30 s, 55℃退火 30 s, 72℃延伸 1 min, 共 44 次循环;最后 72℃延伸 10 min。PCR 产物进行凝胶电泳,参照 1.2 节对目的片段进行回收作为模板,依照 MEGAscript® RNAi Kit (Ambion,美国)操作步骤,合成 dsRNA。

1.6　双链 RNA 显微注射及干扰效果检测

利用显微注射仪(Nanoliter 2010, WPI, 美国)将 Met 基因的 dsRNA 注射到 2 日龄小菜蛾雌蛹内,以 ds*EGFP* 作为对照,每个虫体注射 300 ng dsRNA,收集注射后 0, 24, 48 和 72 h 的样品(每个时间点 3 个重复,每个重复 10 头个体),进行荧光定量 PCR,检测 RNAi 对 Met 基因表达的干扰效果,反应体系及反应程序同 1.4 节。

1.7　小菜蛾的卵巢发育与繁殖力测定

收集 1.6 节 RNA 干扰后初羽化的小菜蛾雌成虫 30 头。10 头用二氧化碳短暂麻醉,解剖其腹部,将其他组织剔除保留卵巢,并洗净其他杂质,进行观察拍照,记录卵子发育情况。另外 20 头与初羽化未交配雄虫在 25±1℃、RH 70%～80%、光周期 16L:8D 条件下进行交配,记录每一对 3 d 内总产卵量。对照选用注射 ds*EGFP* 的初羽化雌成虫。

1.8　数据分析

基因表达量采用 $2^{-\Delta C_T}$ 法进行换算;小菜蛾不同龄期与不同组织 *Met* 基因的表达量采用 SPSS21.0 统计软件(SPSS Inc., Chicago, Illinous, 美国)进行单因素方差分析(one-way ANOVA)($P<0.05$, Tukey 氏多重比较);小菜蛾初羽化雌成虫的成熟卵子数,以及羽化后 3 d 内单雌产卵量采用独立样本 *T* 检验进行显著性分析($P<0.01$)。

2　结果

2.1　*PxMet* 基因的全长 cDNA 验证与序列分析

克隆获得 2 个 *Met* 基因(图 1), *PxMet*-1 (GenBank 登录号: MK697672)与 *PxMet*-2(GenBank 登录号: MK697673)开放阅读框(ORF)全长分别为 1 575 和 2 100 bp,分别编码 524 与 699 个氨基酸。PxMet-1 与 PxMet-2 蛋白分子质量分别为 60.5 和 70.7 kD,预测等电点(pI)分别为 6.73 和 5.50。

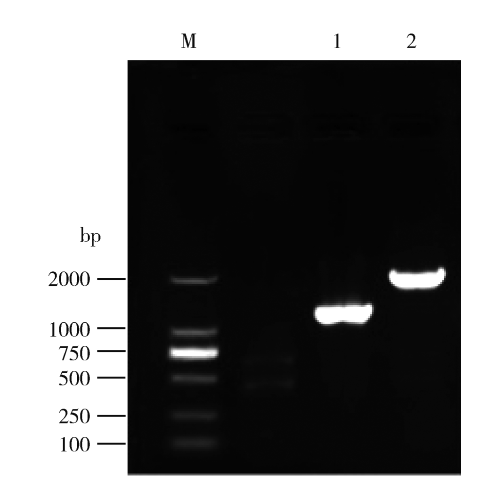


图 1　小菜蛾 *PxMet*-1 和 *PxMet*-2 PCR 扩增结果

Fig. 1　PCR amplification of *PxMet*-1 and *PxMet*-2 of *Plutella xylostella*

M: DL2000 Maker; 1: *PxMet*-1; 2: *PxMet*-2.

2.2　小菜蛾 Mets 蛋白的保守结构域

小菜蛾 PxMet-1 和 PxMet-2 均具有 4 个保守结构域,即 1 个 helix-loop-helix 结构域(bHLH)、2 个 PAS 保守基序以及 1 个 PAC 保守基序(图 2),与其他已知物种的 Mets 较一致。

2.3　Mets 基因的多序列比对及进化分析

将获得的小菜蛾 Met 氨基酸序列利用 BLAST-X 在 NCBI 中进行比对分析发现: 小菜蛾 PxMet-1 与家蚕 *B. mori* 的 Met-1 和 Met-2 的氨基酸序列一致性最高,分别可达 67.8% 和 60.3%,其次是与赤拟谷盗 *T. castaneum*、黑腹果蝇 *D. melanogaster* 和埃及伊蚊 *A. aegypti* Met,氨基酸序列一致性分别为

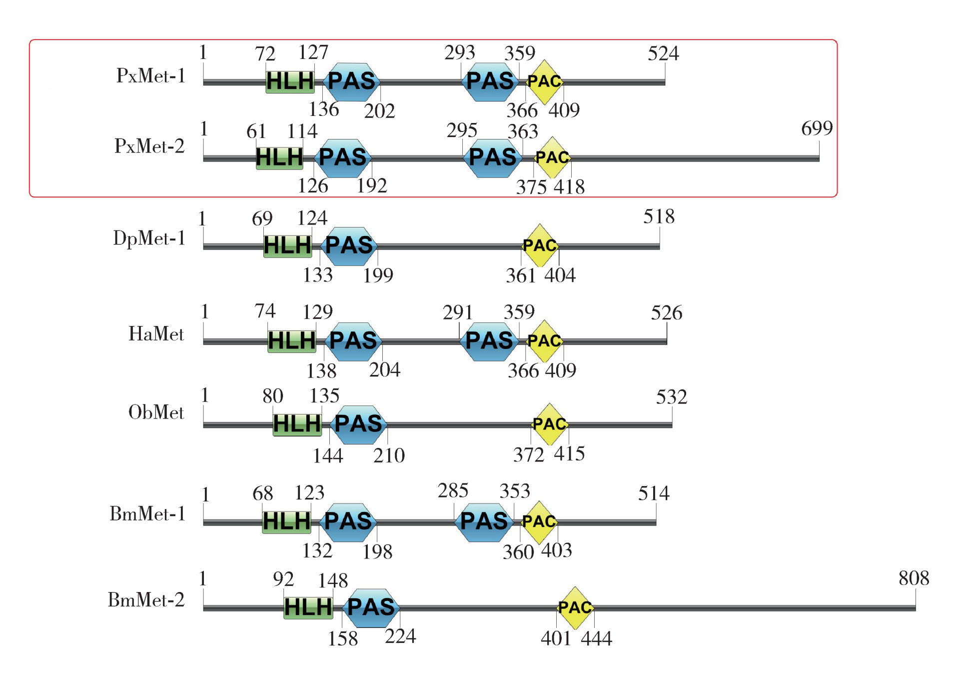


图 2 小菜蛾 PxMet-1 和 PxMet-2 蛋白及其他昆虫 Met 蛋白的保守结构域

Fig. 2 Predicted conserved domains of PxMet-1 and PxMet-2 of *Plutella xylostella* and Met proteins from other insects

Met 蛋白来源物种及 GenBank 登录号 Origin species of Met proteins and their GenBank accession numbers: PxMet-1: 小菜蛾 *Plutella xylostella* (MK697672); PxMet-2: 小菜蛾 *Plutella xylostella* (MK697673); DpMet-1: 帝王斑蝶 *Danaus plexippus* (OWR52183.1); HaMet: 棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (AHX26585.1); ObMet: 冬尺蠖蛾 *Operophtera brumata* (KOB74415.1); BmMet-1: 家蚕 *Bombyx mori* (NP_001108458.1); BmMet-2: 家蚕 *Bombyx mori* (BAJ05086.1).

26.7%, 23.7% 和 19.0%；而小菜蛾 PxMet-2 与其他鳞翅目昆虫的 Met 氨基酸序列一致性相对较低，与家蚕 *B. mori* Met-1 和 Met-2 氨基酸序列一致性分别为 51.34% 和 33.69%，其次是与黑腹果蝇 *D. melanogaster*、赤拟谷盗 *T. castaneum* 和埃及伊蚊 *A. aegypti* Met，氨基酸序列一致性分别为 21.7%，21.5% 和 18.7%（图 3）。

利用 MEGA6.06，采用 NJ(neighbor joining) 法对已报道的昆虫 Mets 序列进行比对，并构建系统发育树，结果显示，小菜蛾 PxMet-1 和 PxMet-2 聚为不同的两支，说明小菜蛾 PxMet-1 与 PxMet-2 可能具有不同的生物学功能以及进化模式，但两者均与鳞翅目昆虫 Met 聚在一起，分别与帝王斑蝶 *Danaus plexippus* 的 Met-1 与 Met-2 聚在一起，说明小菜蛾 PxMet-1 和 PxMet-2 仍然具有较高的进化保守性（图 4）。

2.4 Mets 基因在小菜蛾不同发育阶段与成虫组织中的表达模式

PxMet-1 和 *PxMet*-2 在小菜蛾不同发育阶段的表达模式存在差异，在蛹期(化蛹后 1－3 d)与雌成虫期(羽化后 0－72 h)均有表达，*PxMet*-1 在蛹期的表达量无明显差异，但均显著高于雌成虫期(羽化后 0－48 h)($P<0.05$)；而 *PxMet*-2 在雌成虫期(羽化后 0－48 h)的表达量呈先上升后下降的趋势，在羽化后 12 h 出现表达高峰，且成虫期(羽化后 0－36 h)的表达量显著高于蛹期($P<0.05$)(图 5：A，B)；此结果与小菜蛾不同龄期的转录组数据(未发表数据)较为一致。*PxMet*-1 与 *PxMet*-2 均在雌成虫羽化后 72 h 出现一个明显的表达升高(图 5：A，B)。在组织表达模式分析中发现，两个基因均在脂肪体中显著高表达($P<0.05$)(图 5：C，D)。

2.5 Met 基因 RNAi 效应分析

同时注射 *PxMet*-1 和 *PxMet*-2 的 dsRNA 24 h 后，小菜蛾 *PxMet*-1 和 *PxMet*-2 基因的表达量显著低于注射 ds*EGFP* 的对照组(*PxMet*-1：$t=3.108$，$df=4$，$P=0.036$；*PxMet*-2：$t=6.516$，$df=4$，$P=0.003$)(图 6)。

2.6 RNAi 干扰 Met 基因后对小菜蛾雌成虫繁殖力的影响

RNAi 干扰小菜蛾 *PxMet*-1 与 *PxMet*-2 基因后，小菜蛾初羽化雌成虫的成熟卵子数为 19.8±1.3 个，显著低于对照组小菜蛾的成熟卵子数 42.8±1.6 个($t=11.176$，$df=18$，$P<0.01$)(图 7：A)。而产卵量结果显示，同时注射 *PxMet*-1 与 *PxMet*-2 基

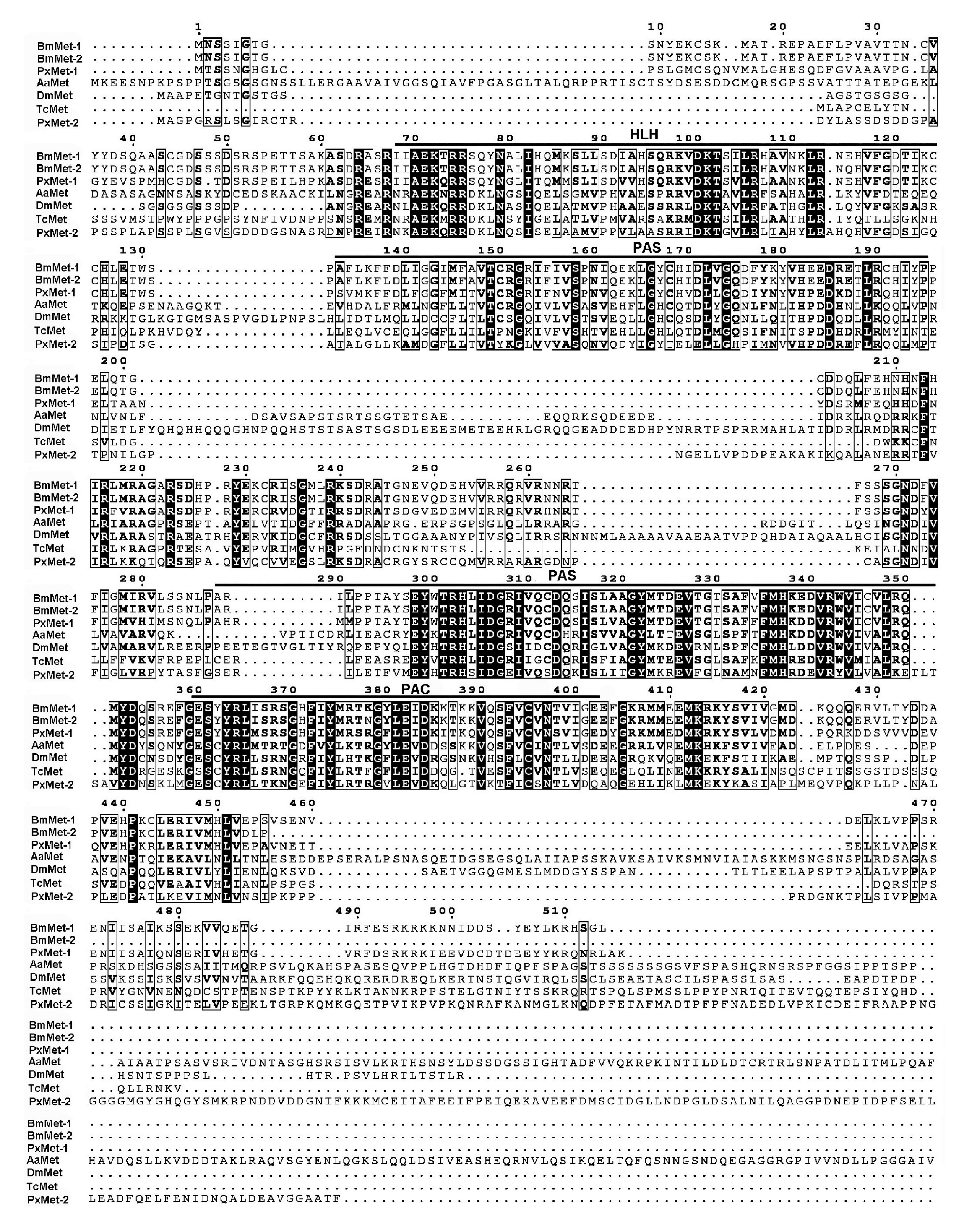


图 3　昆虫 Met 氨基酸序列比对

Fig. 3　Amino acid sequence alignment of Mets in insects

Met 蛋白来源物种及 GenBank 登录号 Origin species of Met proteins and their GenBank accession numbers：BmMet-1：家蚕 *Bombyx mori*（NP_001108458.1）；BmMet-2：家蚕 *Bombyx mori*（BAJ05086.1）；PxMet-1：小菜蛾 *Plutella xylostella*（MK697672）；PxMet-2：小菜蛾 *Plutella xylostella*（MK697673）；AaMet：埃及伊蚊 *Aedes aegypti*（AAX55681.1）；DmMet：黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*（AAF48071.1）；TcMet：赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*（NP_001092812.1）.

因的 dsRNA，小菜蛾羽化后 3 d 内单雌产卵量为 63.1 ± 7.5 个，显著低于注射 ds*EGFP* 的对照组（115.7 ±9.0 个）（t = 4.496，df = 34，P < 0.01）（图 7：B）。

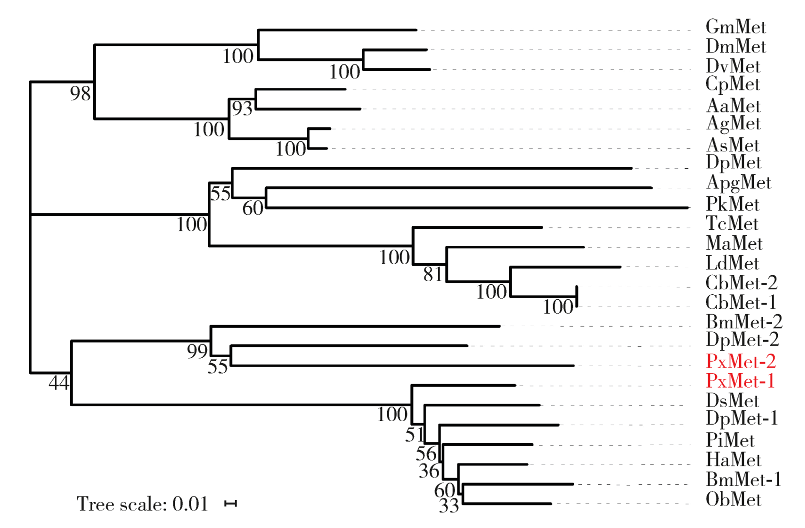


图 4 基于小菜蛾 PxMet-1 和 PxMet-2 与其他昆虫 Met 氨基酸序列的系统发育进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on the amino acid sequences of PxMet-1 and PxMet-2 from *Plutella xylostella* and Mets from other insects

Met 蛋白来源物种及 GenBank 登录号 Origin species of Met proteins and their GenBank accession numbers: GmMet: 刺舌蝇 *Glossina morsitans* (AFQ01087.1); DmMet: 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (AAF48071.1); DvMet: 黑果蝇 *Drosophila virilis* (XP_002055682.1); CpMet: 尖音库蚊 *Culex pipiens* (AAY25027.1); AaMet: 埃及伊蚊 *Aedes aegypti* (AAX55681.1); AgMet: 冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* (ABC18327.1); AsMet: 中华按蚊 *Anopheles sinensis* (KFB43800.1); DpMet: 太平洋折翅蠊 *Diploptera punctate* (AIM47235.1); ApgMet: 棉蚜 *Aphis gossypii* (ANZ54966.1); PkMet: 日本臀纹粉蚧 *Planococcus kraunhiae* (BAU79435.1); TcMet: 赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* (NP_001092812.1); MaMet: 松墨天牛 *Monochamus alternatus* (ANW09588.1); LdMet: 马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* (AKG92748.1); CbMet-2: 大猿叶甲 *Colaphellus bowringi* (AMK38170.1); CbMet-1: 大猿叶甲 *Colaphellus bowringi* (AMK38169.1); BmMet-2: 家蚕 *Bombyx mori* (BAJ05086.1); DpMet-2: 帝王斑蝶 *Danaus plexippus* (OWR51919.1); PxMet-2: 小菜蛾 *Plutella xylostella* (MK697673); PxMet-1: 小菜蛾 *Plutella xylostella* (MK697672); DsMet: 赤松毛虫 *Dendrolimus spectabilis* (ATB19377.1); DpMet-1: 帝王斑蝶 *Danaus plexippus* (OWR52183.1); PiMet: 印度谷螟 *Plodia interpunctella* (ANZ54967.1); HaMet: 棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (AHX26585.1); BmMet-1: 家蚕 *Bombyx mori* (NP_001108458.1); ObMet: 冬尺蠖蛾 *Operophtera brumata* (KOB74415.1). 标尺示遗传距离。The scale bar indicates the genetic distance.

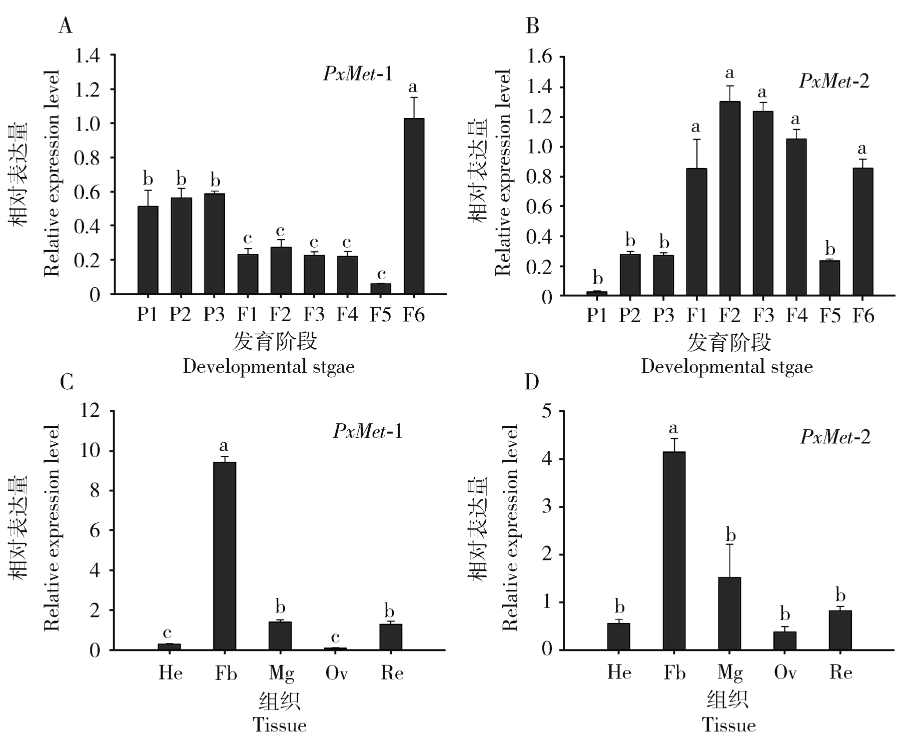


图 5 *PxMet*-1 与 *PxMet*-2 基因在小菜蛾不同发育阶段(A, B)和成虫不同组织(C, D)中的表达模式

Fig. 5 Expression patterns of *PxMet*-1 and *PxMet*-2 in different developmental stages (A, B) and adult tissues (C, D) of *Plutella xylostella*

P1 – P3: 分别为 1 – 3 日龄蛹 1 – 3 day-old pupa, respectively; F1 – F6: 分别为羽化后 0, 12, 24, 36, 48 和 72 h 的雌成虫 Female adult at 0, 12, 24, 36, 48 and 72 h after eclosion, respectively; He: 头 Head; Fb: 脂肪体 Fat body; Mg: 中肠 + 马氏管 Midgut + Malpighian tubules; Ov: 卵巢 Ovary; Re: 残渣 Residue. 柱上不同字母表示差异显著($P < 0.05$, Tukey 氏多重比较)。Different letters above bars represent significant difference ($P < 0.05$, Tukey's HSD multiple test).

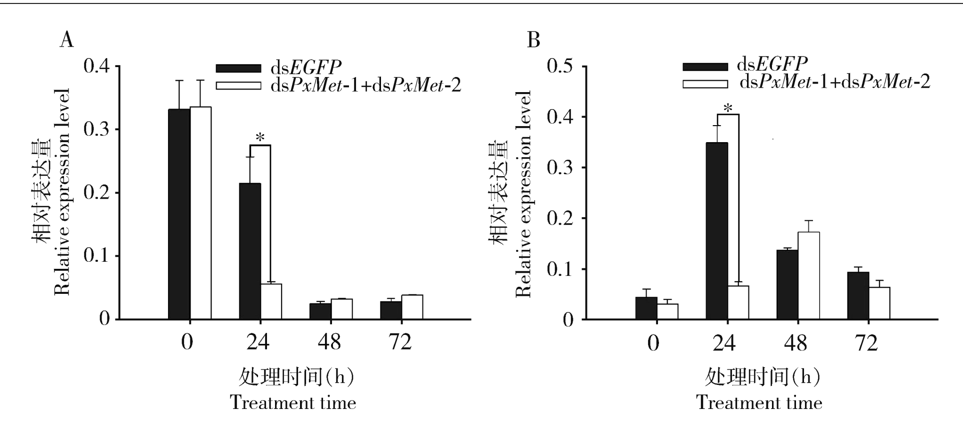


图 6　RNAi 后小菜蛾成虫 *PxMet*-1 (A)与 *PxMet*-2 (B)基因的相对表达量

Fig. 6　Relative expression levels of *PxMet*-1 (A) and *PxMet*-2 (B) in *Plutella xylostella* adults after RNAi

ds*PxMet*-1 + ds*PxMet*-2：同时注射 *PxMet*-1 与 *PxMet*-2 的 dsRNA Injection of the dsRNAs of *PxMet*-1 and *PxMet*-2；ds*EGFP*：注射 *EGFP* dsRNA(对照)Injection of the dsRNA of *EGFP* (the control). 柱上星号表示差异显著($P<0.05$, Tukey 氏多重比较)。Asterisk above bars represents significant difference ($P<0.05$, Tukey's HSD multiple test).

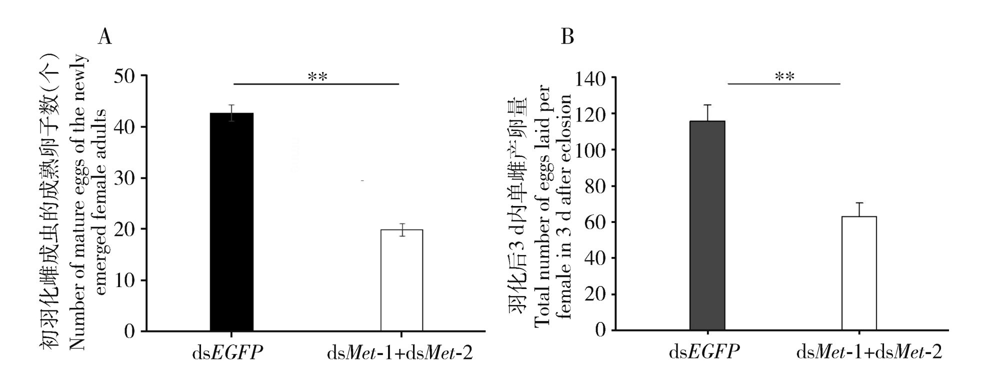


图 7　RNAi 干扰 Met 基因后小菜蛾初羽化雌成虫的成熟卵子数(A)和羽化后 3 d 内单雌产卵量(B)

Fig. 7　Number of mature eggs of newly emerged female adults (A) and the number of eggs laid per female in 3 d after eclosion (B) of *Plutella xylostella* after RNAi of Met genes

ds*PxMet*-1 + ds*PxMet*-2：同时注射 *PxMet*-1 与 *PxMet*-2 的 dsRNA Injection of the dsRNAs of *PxMet*-1 and *PxMet*-2；ds*EGFP*：注射 *EGFP* 的 dsRNA (对照)Injection of the dsRNA of *EGFP* (the control). 柱上双星号表示差异极显著($P<0.01$, Tukey 氏多重比较)。Double asterisk above bars represents extremely significant difference ($P<0.01$, Tukey's HSD multiple test).

3　讨论

不同种类昆虫生殖调控所响应的激素类型并不相同(Belles, 2004; Roy *et al*., 2018)。已有研究证实半变态类昆虫，包括东亚飞蝗 *L. migratoria* (Song *et al*., 2014; Luo *et al*., 2017)、褐飞虱 *N. lugens* (Lu *et al*., 2016)以及德国小蠊 *B. germanica* (Comas *et al*., 2001)等的生殖过程主要受 JH 调控。然而，全变态类昆虫，尤其是鳞翅目昆虫，其生殖过程的激素调控机制则不尽相同，这主要取决于卵黄发生的时间(Belles, 2004)。卵黄发生开始于成虫羽化之后时，JH 作为主要因子参与生殖调控，如烟草天蛾 *Manduca sexta*；卵黄发生开始于幼虫期或预蛹期时，20E 可能主要负责生殖调控，如家蚕 *B. mori* (Swevers and Iatrou, 2009)；而卵黄发生开始于蛹期－成虫期之间时，JH 与 20E 可能在生殖调控过程中分别承担了作用，如小菜蛾(邹明民, 2015)。越来越多的证据表明，*Met* 在 JH 分子信号途径中具有至关重要的作用，因此，本实验首先明确了小菜蛾 *PxMets* 的分子结构、表达模式及基因功能，初步阐明了其在小菜蛾生殖调控中的作用，以期为解析小菜蛾生殖调控的分子机理奠定基础。

已有研究表明，大多昆虫仅具有一个 *Met* 基因(Marchal *et al*., 2014; Lin *et al*., 2015)，我们最终鉴定出两个小菜蛾保幼激素受体基因 *PxMet*-1 与 *PxMet*-2，与家蚕 *B. mori* 和帝王斑蝶 *D. plexippus* 的(Zhan *et al*., 2011; Suetsugu *et al*., 2013)一致。PxMet-1 和 PxMet-2 均属于 basic-helix-loop-helix/Per-Arnt-Sim(bHLH-PAS)超家族，具有该蛋白家族

所具有的保守结构域,即 1 个螺旋-环-螺旋结构域(helix-loop-helix, bHLH),2 个 PAS 保守基序,以及 1 个 PAC 保守基序。这与大多昆虫的 Met 结构域较一致(Lozano and Belles, 2014; Lin *et al*., 2015),但也有一些种类的昆虫具有的 PAS 基序数量不同(Zhan *et al*., 2011; Marchal *et al*., 2014),说明 Met 在不同种类昆虫中可能具有不同的功能。

小菜蛾 *PxMet*-1 在蛹期相对高表达,而 *PxMet*-2 则主要在成虫期高表达,具有龄期表达偏好性,推测 *PxMet*-1 与 *PxMet*-2 的主要功能可能不同,比如在蛹期高表达时可能与变态发育、翅型分化相关(Kayukawa *et al*., 2014; Lozano and Belles, 2014),而在成虫期高表达时可能主要参与调控了生殖发育与寿命过程(Smykal *et al*., 2014; Hejnikova *et al*., 2016)。而小菜蛾 *PxMet*-1 与 *PxMet*-2 主要参与的生理过程还有待我们进一步探究。小菜蛾 *PxMet*-1 与 *PxMet*-2 均在成虫脂肪体内显著高表达,这一结果与帝王斑蝶 *D. plexippus*(Marchal *et al*., 2014)和飞蝗 *L. migratoria* 的结果(Guo *et al*., 2014)较一致。研究表明,Met 基因在维持脂肪体细胞内的 DNA 复制与多倍化具有至关重要的作用,这一过程能够促进 Vg 的合成,从而加速卵母细胞的成熟(Guo *et al*., 2014; Wu *et al*., 2016)。

前期研究证实,小菜蛾卵黄发生开始于蛹期第 1 天后(邹明民, 2015),因此我们选择化蛹后第 2 天的小菜蛾雌蛹进行 RNA 干扰,研究 *Met* 基因在小菜蛾生殖发育中的作用。同时干扰小菜蛾 *PxMet*-1 与 *PxMet*-2 24 h 时,小菜蛾 *PxMet*-1 与 *PxMet*-2 表达量显著下降,但持续时间较短,48 h 即恢复,这可能与鳞翅目蛾类昆虫的 RNAi 的干扰效率普遍不佳有关(Terenius *et al*., 2011)。抑制 *PxMet*-1 与 *PxMet*-2 的表达后,小菜蛾初羽化雌成虫的成熟卵子数目减少,产卵量也随之下降。研究表明运用 RNAi 干扰太平洋折翅蠊 *Diploptera punctate Met*,阻碍其卵母细胞发育以及卵黄原蛋白产生(Marchal *et al*., 2014);然而,干扰飞蝗 *L. migratoria* Met 基因影响其卵母细胞成熟(Guo *et al*., 2014)。Smykal 等(2014)研究也发现,干扰 Met 基因,始红蝽 *Pyrrhocoris apterus* 卵巢发育及卵黄原蛋白表达受到明显抑制。同样,Li 等(2011)干扰埃及伊蚊 *A. aegypti Met* 造成其产卵量显著降低。

本研究鉴定了小菜蛾 Met 基因的分子结构特征与表达模式,并利用 RNAi 技术初步阐明了 Met 基因在小菜蛾生殖发育中的作用。由于 RNAi 干扰效应的制约,本实验对小菜蛾 *PxMet*-1 与 *PxMet*-2 同时进行了干扰,但 *PxMet*-1 与 *PxMet*-2 在小菜蛾生殖发育中是否具有不同的作用,两个基因是否存在互作效应,及其所诱导的下游信号通路是否不一致仍有待我们后续进一步研究。

参考文献(References)

Baxter SW, Chen M, Dawson A, Zhao JZ, Vogel H, Shelton AM, Heckel DG, Jiggins CD, 2010. Mis-spliced transcripts of nicotinic acetylcholine receptor α6 are associated with field evolved spinosad resistance in *Plutella xylostella* (L.). *PLoS Genet*., 6(1): e1000802.

Belles X, 2004. Vitellogenesis directed by juvenile hormone. In: Raikhel AS, Sappington TW eds. Reproductive Biology of Invertebrates, Vol. 12, Part B: Progress in Vitellogenesis. Science Publishers, Enfield, USA/Plymouth, UK. 157-198.

Bilen J, Atallah J, Azanchi R, Levine JD, Riddiford LM, 2013. Regulation of onset of female mating and sex pheromone production by juvenile hormone in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110(25): 18321-18326.

Charles JP, Iwema T, Epa VC, Takaki K, Rynes J, Jindra M, 2011. Ligand-binding properties of a juvenile hormone receptor, Methoprene-tolerant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108(52): 21128-21133.

Comas D, Piulachs MD, Bellés X, 2001. Induction of vitellogenin gene transcription *in vitro* by juvenile hormone in *Blattella germanica*. *Mol. Cell. Endocrinol*., 183(1-2): 93-100.

Fathi SAA, Bozorg-Amirkalaee M, Sarfaraz RM, 2011. Preference and performance of *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) on canola cultivars. *J. Pest Sci*., 84(1): 41-47.

Fei H, Martin TR, Jaskowiak KM, Hatle JD, Whitman DW, Borst DW, 2005. Starvation affects vitellogenin production but not vitellogenin mRNA levels in the lubber grasshopper, *Romalea microptera*. *J. Insect Physiol*., 51(4): 435-443.

Furlong MJ, Wright DJ, Dosdall LM, 2013. Diamondback moth ecology and management: problems, progress, and prospects. *Annu. Rev. Entomol*., 58: 517-541.

Godlewski J, Wang S, Wilson TG, 2006. Interaction of bHLH-PAS proteins involved in juvenile hormone reception in *Drosophila*. *Biochem. Biophys. Res. Commun*., 342(4): 1305-1311.

Guo W, Wu ZX, Song JS, Jiang F, Wang ZM, Deng S, Walker VK, Zhou ST, 2014. Juvenile hormone-receptor complex acts on *Mcm*4 and *Mcm*7 to promote polyploidy and vitellogenesis in the migratory locust. *PLoS Genet*., 10(10): e1004702.

Hejnikova M, Paroulek M, Hodkova M, 2016. Decrease in *Methoprene tolerant* and *Taiman* expression reduces juvenile hormone effects and enhances the levels of juvenile hormone circulating in males of the linden bug *Pyrrhocoris apterusi*. *J. Insect Physiol*., 93-94: 72-80.

Hu Q, Liu YD, 2003. Progress and summarization of study on

diamondback moth (*Plutella xylostella* L.). *J. Tianjin Agric. Coll.*, 10(1): 33-36. [胡奇, 刘玉冬, 2003. 小菜蛾研究的概况与进展. 天津农学院学报, 10(1): 33-36]

Jindra M, Palli SR, Riddiford LM, 2013. The juvenile hormone signaling pathway in insect development. *Annu. Rev. Entomol.*, 58: 181-204.

Kayukawa T, Murata M, Kobayashi I, Muramatsu D, Okada C, Uchino K, Sezutsu H, Kiuchi M, Tamura T, Hiruma K, Ishikawa Y, Shinoda T, 2014. Hormonal regulation and developmental role of Krüppel homolog 1, a repressor of metamorphosis, in the silkworm *Bombyx mori*. *Dev. Biol.*, 388(1): 48-56.

Konopova B, Jindra M, 2007. Juvenile hormone resistance gene *Methoprene-tolerant* controls entry into metamorphosis in the beetle *Tribolium castaneum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(25): 10488-10493.

Li M, Mead EA, Zhu J, 2011. Heterodimer of two bHLH-PAS proteins mediates juvenile hormone-induced gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108(2): 638-643.

Li ZY, Feng X, Liu SS, You MS, Furlong MJ, 2016. Biology, ecology, and management of the diamondback moth in China. *Annu. Rev. Entomol.*, 61: 277-296.

Lin XD, Yao Y, Wang B, 2015. Methoprene-tolerant (Met) and Krüpple-homologue 1 (Kr-h1) are required for ovariole development and egg maturation in the brown plant hopper. *Sci. Rep.*, 5: 18064.

Liu W, Li Y, Zhu L, Zhu F, Lei CL, Wang XP, 2016. Juvenile hormone facilitates the antagonism between adult reproduction and diapause through the methoprene-tolerant gene in the female *Colaphellus bowringi*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 74: 50-60.

Lozano J, Belles X, 2014. Role of methoprene-tolerant (Met) in adult morphogenesis and in adult ecdysis of *Blattella germanica*. *PLoS ONE*, 9(7): e103614.

Lu K, Chen X, Liu WT, Zhang XY, Chen MX, Zhou Q, 2016. Nutritional signaling regulates vitellogenin synthesis and egg development through juvenile hormone in *Nilaparvata lugens* (Stål). *Int. J. Mol. Sci.*, 17(3): 269.

Luo MW, Li D, Wang ZM, Guo W, Kang L, Zhou ST, 2017. Juvenile hormone differentially regulates two *Grp*78 genes encoding protein chaperones required for insect fat body cell homeostasis and vitellogenesis. *J. Biol. Chem.*, 292(21): 8823-8834.

Marchal E, Hult EF, Huang J, Pang Z, Stay B, Tobe SS, 2014. Methoprene-tolerant (*Met*) knockdown in the adult female cockroach, *Diploptera punctata*, completely inhibits ovarian development. *PLoS ONE*, 9(9): e106737.

Mirth CK, Tang HY, Makohon-Moore SC, Salhadar S, Gokhale RH, Warner RD, Koyama T, Riddiford LM, Shingleton AW, 2014. Juvenile hormone regulates body size and perturbs insulin signaling in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 111(19): 7018-7023.

Nijhout HF, 1994. Genes on the wing. *Science*, 265(5168): 44-46.

Nouzova M, Edwards MJ, Mayoral JG, Noriega FG, 2011. A coordinated expression of biosynthetic enzymes controls the flux of juvenile hormone precursors in the corpora allata of mosquitoes. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 41(9): 660-669.

Peng L, Zou MM, Ren NN, Xie M, Vasseur L, Yang YF, He WY, Yang G, Gurr GM, Hou YM, You SJ, You MS, 2015. Generation-based life table analysis reveals manifold effects of inbreeding on the population fitness in *Plutella xylostella*. *Sci. Rep.*, 5: 12749.

Roy S, Saha TT, Zou Z, Raikhel AS, 2018. Regulatory pathways controlling female insect reproduction. *Annu. Rev. Entomol.*, 63: 489-511.

Smykal V, Bajgar A, Provaznik J, Fexova S, Buricova M, Takaki K, Hodkova M, Jindra M, Dolezel D, 2014. Juvenile hormone signaling during reproduction and development of the linden bug, *Pyrrhocoris apterus*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 45: 69-76.

Song JS, Wu ZX, Wang ZM, Deng S, Zhou ST, 2014. Krüppel-homolog 1 mediates juvenile hormone action to promote vitellogenesis and oocyte maturation in the migratory locust. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 52: 94-101.

Soufbaf M, Fathipour Y, Karimzadeh J, Zalucki MP, 2010. Bottom-up effect of different host plants on *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae): a life-table study on canola. *J. Econ. Entomol.*, 103(6): 2019-2027.

Suetsugu Y, Futahashi R, Kanamori H, Kadono-Okuda K, Sasanuma S, Narukawa J, Ajimura M, Jouraku A, Namiki N, Shimomura M, 2013. Large scale full-length cDNA sequencing reveals a unique genomic landscape in a lepidopteran model insect, *Bombyx mori*. *G3: Genes Genom. Genet.*, 3(9): 1481-1492.

Sun B, Jiang X, Zhang L, Stanley DW, Luo LZ, Long W, 2013. Methoprene influences reproduction and flight capacity in adults of the rice leaf roller, *Cnaphalocrocis medinalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Arch. Insect Biochem.*, 82(1): 1-13.

Swevers L, Iatrou K, 2009. Ecdysteroids and ecdysteroid signaling pathways during insect oogenesis. In: Smagghe G ed. Ecdysone: Structures and Functions. Springer, Dordrecht, Netherland. 127-164.

Tang WQ, Yu LY, He WY, Yang G, Ke FS, Baxter SW, You SJ, Douglas CJ, You MS, 2014. DBM-DB: the diamondback moth genome database. *Database*, 2014: bat087.

Terenius O, Papanicolaou A, Garbutt JS, Eleftherianos I, Huvenne H, Kanginakudru S, Albrechtsen M, An C, Aymeric JL, Barthel A, Bebas P, Bitra K, Bravo A, Chevalier F, Collinge DP, Crava CM, de Maagd RA, Duvic B, Erlandson M, Faye I, Felföldi G, Fujiwara H, Futahashi R, Gandhe AS, Gatehouse HS, Gatehouse LN, Giebultowicz JM, Gómez I, Grimmelikhuijzen CJP, Groot AT, Hauser F, Heckel DG, Hegedus DD, Hrycaj S, Huang L, Hull JJ, Iatrou K, Iga M, Kanost MR, Kotwica J, Li C, Li J, Liu J, Lundmark M, Matsumoto S, Meyering-Vos M, Millichap PJ, Monteiro A, Mrinal N, Niimi T, Nowara D, Ohnishi A, Oostra V, Ozaki K, PapakonstantinouM, Popadic A, Rajam MV, Saenko S, Simpson RM, Soberón M, Strand MR, Tomita S, Toprak U, Wang P, Wee CW, Whyard S, Zhang W, Nagaraju J, French-Constant RH, Herrero S, Gordon K, Swevers L, Smagghe G, 2011. RNA interference in Lepidoptera: an overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. *J.*

Insect Physiol., 57(2): 231-245.

Wang XH, Fang XD, Yang PC, Jiang XT, Jiang F, Zhao DJ, Li BL, Cui F, Wei JN, Ma CA, Wang YD, He J, Luo Y, Wang ZF, Guo XJ, Guo W, Wang XS, Zhang Y, Yang ML, Hao SG, Chen B, Ma ZY, Yu D, Xiong ZQ, Zhu YB, Fan DD, Han LJ, Wang B, Chen YX, Wang JW, Yang L, Zhao W, Feng Y, Chen GX, Lian JM, Li QY, Huang ZY, Yao XM, Lv N, Zhang GJ, Li YR, Wang J, Wang J, Zhu BL, Kang L, 2014. The locust genome provides insight into swarm formation and long-distance flight. *Nat. Commun*., 5: 2957.

Wei H, Wang J, Li HS, Dai HG, Gu XJ, 2010. Sub-lethal effects of fenvalerate on the development, fecundity, and juvenile hormone esterase activity of diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). *Agr. Sci. China*, 9(11): 1612-1622.

Wilson TG, DeMoor S, Lei J, 2003. Juvenile hormone involvement in *Drosophila melanogaster* male reproduction as suggested by the *Methoprene-tolerant*[27] mutant phenotype. *Insect Biochem. Molec. Biol*., 33(12): 1167-1175.

Wu ZX, Guo W, Xie YT, Zhou ST, 2016. Juvenile hormone activates the transcription of cell-division-cycle 6 (*Cdc6*) for polyploidy-dependent insect vitellogenesis and oogenesis. *J. Biol. Chem*., 291(10): 5418-5427.

Xu J, Sheng Z, Palli SR, 2013. Juvenile hormone and insulin regulate trehalose homeostasis in the red flour beetle, *Tribolium castaneum. PLoS Genet*., 9(6): e1003535.

Yamamoto R, Bai H, Dolezal AG, Dolezal GA, Amdam G, Tatar M, 2013. Juvenile hormone regulation of *Drosophila* aging. *BMC Biol*., 11(1): 85.

Zalucki MP, Shabbir A, Silva R, Adamson D, Liu SS, Furlong MJ, 2012. Estimating the economic cost of one of the world's major insect pests, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae): just how long is a piece of string? *J. Econ. Entomol*., 105(4): 1115-1129.

Zhan S, Merlin C, Boore JL, Reppert SM, 2011. The monarch butterfly genome yields insights into long-distance migration. *Cell*, 147: 1171-1185.

Zhou ST, Guo W, Song JS, 2012. Molecular mechanisms of juvenile hormone action. *Chin. J. Appl. Entomol*., 49(5): 1087-1094. [周树堂, 郭伟, 宋佳晟, 2012. 保幼激素的分子作用机制研究. 应用昆虫学报, 49(5): 1087-1094]

Zou MM, 2015. Molecular Cloning, Expression Profiling and Function Analysis of Vitellogenin Gene in the Diamondback moth, *Plutella xylostella*. MSc Thesis, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou. [邹明民, 2015. 小菜蛾卵黄原蛋白基因的克隆、表达与功能分析. 福州: 福建农林大学硕士论文]

Zou Z, Saha T, Roy S, Shin SW, Backman TWH, Girke T, White KP, Raikhel AS, 2013. Juvenile hormone and its receptor, methoprene-tolerant, control the dynamics of mosquito gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110(24): E2173-E2181.

(责任编辑: 马丽萍)